

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-250700

(43)Date of publication of application : 03.10.1995

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

C12Q 1/70

(21)Application number : 06-071701

(71)Applicant : TONEN CORP

TANAKA EIJI

MATSUMOTO AKIHIRO

(22)Date of filing : 15.03.1994

(72)Inventor : TANAKA EIJI

MATSUMOTO AKIHIRO

YAMAGUCHI KENJIRO

(54) SIMPLE QUANTIFICATION OF NUCLEIC ACID BY COMPETITIVE PCR PROCESS

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject quantification enabling the number of tubes in PCR per specimen to be reduced at least by half, therefore having such advantages as the shortening working time, improvement in operating efficiency and cost reduction etc.

CONSTITUTION: This method is to quantify the DNA or RNA in a specimen by competitive PCR process. The DNA or RNA in the specimen, at least two kinds of competitive bodies having partial deletion, transfection or mutation in the sequences, one kind of sense or anti-sense primer capable of annealing said DNA or RNA and any of the competitive bodies, and the corresponding anti-sense or sense primers capable of annealing with only one kind of the competitive bodies differing from one another and same in the number of the competitive bodies, are subjected to gene amplification in the identical vessel, and the resultant product is put to electrophoresis to quantify the DNA or RNA.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-250700

(43)公開日 平成7年(1995)10月3日

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|---------|----------------|---------|
| C 1 2 Q 1/68 | A | 9453-4B | | |
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | | | |
| C 1 2 Q 1/70 | | 9453-4B | | |
| | | 9281-4B | C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A |

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平6-71701

(22)出願日 平成6年(1994)3月15日

(71)出願人 390022998

東燃株式会社

東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(74)上記1名の復代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

(71)出願人 594061698

田中 栄司

長野県松本市岡田松岡73-5

(71)出願人 594061702

松本 晶博

長野県松本市桐2-3-26 F Yコーポ
203号室

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 競合PCR法による核酸の簡易定量法

(57)【要約】

【構成】 サンプル中のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する方法であり、サンプル中のDNA又はRNAと、配列内部に部分的に欠失、挿入又は変異を有する競合体少なくとも2種と、そのDNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種のセンス又はアンチセンスプライマーと、互いに異なる競合体1種のみとアニーリング可能であり競合体数と同数の対応のアンチセンス又はセンスプライマーとを同一容器内で遺伝子増幅し、その産物を電気泳動分析にかけてDNA又はRNAを定量する方法。

【効果】 1検体あたりPCR時のチューブ数を半減以下に減らすことができ、これにより作業時間の短縮、作業効率の向上、コスト削減などの利点をもつ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する方法であって、

(i) サンプル中の前記DNA又はRNAと、少なくとも2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記DNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性をもち且つ前記DNA又はRNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記DNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種のセンス又はアンチセンスプライマーと、このプライマーに対応しこれと異なる配列を有し且つ前記競合体の種類と同数のアンチセンス又はセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体1種のみとアニーリング可能である前記アンチセンス又はセンスプライマーとを同一容器内で競合PCR法にかけて、サンプル由来の前記DNA又はRNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、

(ii) ステップ(i)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記DNA又はRNAのコピー数を決定する、ことを包含する前記方法。

【請求項2】 サンプル中の微量のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する方法であって、

(i) サンプル中の前記DNA又はRNAと、少なくとも2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記DNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性をもち且つ前記DNA又はRNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記DNAもしくは前記RNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1のセンス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記DNA又はRNAを増幅し、

(ii) ステップ(i)の増幅産物に、前記DNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のセンス又はアンチセンスプライマーと、このプライマーに対応しこれと異なる配列を有し且つ前記競合体の種類と同数の第2のアンチセンス又はセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体1種のみとアニーリング可能である前記第2のアンチセンス又はセンスプライマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記DNA又はRNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、

(iii) ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記DNA又はRNAのコピー数を決定する、ことを包含する前記方法。

【請求項3】 サンプル中の微量のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する方法であって、

(i) サンプル中の前記DNA又はRNAと、2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記DNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性をもち且つ前記DNA又はRNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記DNAもしくは前記RNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1のセンス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記DNA又はRNAを増幅し、

(ii) ステップ(i)の増幅産物に、前記DNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のセンス又はアンチセンスプライマーと、このプライマーに対応しこれと異なる配列を有する2種の第2のアンチセンス又はセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体のみとアニーリング可能である前記第2のアンチセンス又はセンスプライマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記DNA又はRNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、

(iii) ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記DNA又はRNAのコピー数を決定する、ことを包含する前記方法。

【請求項4】 サンプル中の微量のC型肝炎ウイルスRNAを競合PCR法で定量する方法であって、

(i) サンプル中の前記RNAを予め逆転写酵素により変換して得たcDNAと、2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記cDNAと完全に又は部分的に相同性をもち且つ前記RNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記cDNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1のセンス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記cDNAを増幅し、

(ii) ステップ(i)の増幅産物に、前記cDNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のアンチセンスプライマーと、このプライマーと異なる配列を有する2種の第2のセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体のみとアニーリング可能である前記第2のセンスプライマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記cDNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、

(iii) ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記RNAのコピー数を決定する、ことを包含する前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、競合ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による核酸の定量法に関する。特に、本発明は、微量核酸の定量に有効である。

【0002】

【従来の技術】免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス等の病原性ウイルスや、結核菌、MRSA等の病原性細菌はヒトや他の動物に感染して重篤な疾病を引き起こし、特に免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、MRSA等にあつては直接的又は間接的に死に至らしめることさえある。さらに、このような病原性ウイルスや細菌類の中には、例えば免疫不全ウイルスのように特に血液や性的接触を通して感染し長期間動物体内に潜伏したのち発病せしめるものや、肝炎ウイルス、特にC型肝炎ウイルス(HCV)のようにウイルス汚染された輸血用血液を通して感染し慢性肝炎を経て肝硬変、肝癌へと移行せしめるものや、MRSAのように抵抗力の減退した患者に院内感染するものなど、すでに社会的問題へと発展しているものさえある。

【0003】こうした状況下にあつて、感染源を早期に特定し、輸血用血液においては重大な輸血後感染を抑止するために、また感染患者においては早期治療を可能にするために種々の検査又は診断法が開発され又は開発途上にある。そのために、簡易で且つ精確で且つ迅速な検査、診断法が望まれている。特にHCVの場合には、感染初期の患者又はキャリアの体内、特に血中に存在するウイルス量が非常に少ないため、ウイルス自体を検出することは困難である。そのため、感染初期の患者で血中にウイルスは存在するが、抗体の上昇していない患者や特定の抗原に対する抗体産生の悪い患者においては、抗体検出法ではHCVの感染は検出できず感染を見逃してしまう恐れがある。一般のウイルス感染や細菌感染ではこのような場合、血中の病原体の抗原すなわちウイルスや細菌を検出する抗原検出法が使用されるが、HCVの場合血中のウイルス量が非常に少ないために酵素抗体法で検出することは困難である。また適当な培養法も確立されておらず培養して検出することも難しい状態である。

【0004】このような場合、抗原検出法に代る方法としてウイルス遺伝子を検出するPCR法を用いた遺伝子増幅法が使用されている(須栗真, 核医学技術第12巻, 第1号, 第44~52頁(1992年))。PCR法はDNAを増幅し検出する方法であるが、RNAの場合にもRNAより逆転写酵素(RT)によりcDNAを合成し、これを鋳型にして増幅させるRT-PCR法が用いられる。またPCR法は原理的には1分子の遺伝子が存在すれば、検出可能なまでに増幅させることができるが、実際には1000分子以下のDNA/cDNAを1回の増幅で視覚的に確認できるまで増幅することは困難である。この視覚的に確認するとはアガロースやポリアクリルアミドのゲルでエチジウムブロマイドの染色で確認するということである。このため、非常に分子数の少ない検体/遺伝子を増幅させる場合には、1回目のPCRのあとに1回目のPCRで得られた産物の一部を

さらに2回目のPCRを行ない増幅させるnested-PCRが行なわれる。

【0005】一方、ウイルス量の測定は抗原検出系が確立されていないために、遺伝子の量を測定することにより行なわれている。その1つの方法はカイロン社が開発したブランチドDNAのプローブを用いウイルスのRNAとハイブリッドさせることによりウイルス遺伝子の量を測定する方法である(飯野四郎と日野邦彦, Mebio, 9(11):44-49(1992))。しかしながらこの検出系は遺伝子の増幅を行なわないために感度が悪く、 $10^3 \sim 10^5$ /ml以下のウイルス量の場合には検出できないと考えられている。このため、より一般的にはRT-PCR法を用い、同じチューブに鋳型RNAより短い欠失を導入した競合用のRNAやDNAを加え最終的に同じ量のDNAが増幅されるものをその検体のRNA量とする競合法が行なわれている(金子周一ら, 日本臨床, 第50巻, 第111-116頁, 1992年特別号)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、この競合法では1検体につき1つの競合体しか使用しないために、また、サンプルのRNAと競合法のRNAまたはDNAを同じチューブで競合させ最終的に増幅されたDNA産物の量を比較し、サンプルから得られたDNAとその1種の競合体から得られたDNAが同じ濃さのバンドとしてゲル中で確認できる濃度をウイルス量とするために、ウイルス量の分からない検体を測定する場合、多くのチューブが必要となる。例えば、 $1 \sim 10^5$ 程度のウイルスがいると推定される場合に、10倍きざみで検出する場合には8本のチューブが必要となる。検体を希釈する場合にはチューブの数を減らすことが可能だが、それでも最低4~5本のチューブが必要となり、手間がかかり分析に長時間を要すると共に操作も複雑になる。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、従来の競合PCR法の改良研究を行ない、1検体につき少なくとも2種の競合体を使用することによって、またそれぞれの競合体が異なるプライマーで増幅されるように設計することによって、従来法と比べてチューブの数を半減又はそれ以下に減らせること、したがって分析時間の著しい短縮を可能にすることを見出した。

【0008】本発明は、まず第1に、サンプル中のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する方法であつて、

(i) サンプル中の前記DNA又はRNAと、少なくとも2種の、予備決定されたコピー数の競合体であつて、前記DNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性を持ち且つ前記DNA又はRNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記DNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種のセンス又はアンチセンスプライマーと、このプライマーに対応しこれと異なる配列を有し且つ前記競合

体の種類と同数のアンチセンス又はセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体1種のみとアニーリング可能である前記アンチセンス又はセンスプライマーとを同一容器内で競合PCR法にかけて、サンプル由来の前記DNA又はRNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、(ii)ステップ(i)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記DNA又はRNAのコピー数を決定する、ことを包含する方法を提供する。

【0009】好ましい態様としては、サンプル中の前記RNAが、PCRにかける前に予め逆転写酵素の作用によってcDNAに変換されることを特徴とする上記記載の方法に関する。

【0010】本発明は第2に、サンプル中の微量のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する方法であって、(i)サンプル中の前記DNA又はRNAと、少なくとも2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記DNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性を持ち且つ前記DNA又はRNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記DNAもしくは前記RNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1のセンス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記DNA又はRNAを増幅し、(ii)ステップ(i)の増幅産物に、前記DNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のセンス又はアンチセンスプライマーと、このプライマーに対応しこれと異なる配列を有し且つ前記競合体の種類と同数の第2のアンチセンス又はセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体1種のみとアニーリング可能である前記第2のアンチセンス又はセンスプライマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記DNA又はRNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、(iii)ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記DNA又はRNAのコピー数を決定する、ことを包含する前記方法を提供する。

【0011】また、サンプル中の前記RNAが、PCRにかける前に予め逆転写酵素の作用によってcDNAに変換されることを特徴とする上記記載の方法に関する。

【0012】本発明は第3に、サンプル中の微量のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する方法であって、(i)サンプル中の前記DNA又はRNAと、2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記DNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性を持ち且つ前記DNA又はRNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記DNAもしくは前記RNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1の

センス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記DNA又はRNAを増幅し、(ii)ステップ(i)の増幅産物に、前記DNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のセンス又はアンチセンスプライマーと、このプライマーに対応しこれと異なる配列を有する2種の第2のアンチセンス又はセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体のみとアニーリング可能である前記第2のアンチセンス又はセンスプライマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記DNA又はRNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、(iii)ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記DNA又はRNAのコピー数を決定する、ことを包含する前記方法を提供する。

【0013】また、サンプル中の前記RNAが、PCRにかける前に予め逆転写酵素の作用によってcDNAに変換されることを特徴とする上記記載の方法に関する。

【0014】本発明は第4に、サンプル中の微量のC型肝炎ウイルスRNAを競合PCR法で定量する方法であって、(i)サンプル中の前記RNAを予め逆転写酵素により変換して得たcDNAと、2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記cDNAと完全に又は部分的に相同性を持ち且つ前記RNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記cDNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1のセンス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記cDNAを増幅し、(ii)ステップ(i)の増幅産物に、前記cDNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のアンチセンスプライマーと、このプライマーと異なる配列を有する2種の第2のセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体のみとアニーリング可能である前記第2のセンスプライマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記cDNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、(iii)ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記RNAのコピー数を決定する、ことを包含する前記方法を提供する。

【0015】また、前記2種の競合体がそれぞれ配列番号1及び配列番号2に示されるヌクレオチド配列を有し、前記第1のセンスプライマーが5'-CCTGTGAGGAAGTACTGTC-3'であり、前記第1のアンチセンスプライマーが5'-CACTCGCAAGCACCTATCA-3'であり、前記第2のアンチセンスプライマーが5'-AACACTACTCGGCTAGCAGT-3'であり、並びに前記第2のセンスプライマーが5'-TTCACGCAGAAAGCGT

CTAG-3' 及び 5' -AGCCATAGTGGTC TCGGAACC-3' であることを特徴とする上記記載の方法に関する。

【0016】本発明の競合PCR法は、少なくとも2種類の競合体と、いずれの競合体ともアニーリング可能な1種類のセンス又はアンチセンスプライマー及び、競合体の種類と同数で互いに異なる競合体1種類のみとアニーリング可能である対応のアンチセンス又はセンスプライマーとを用いて増幅反応を行なうことを特徴としている。

【0017】本明細書中、「競合体」なる用語は、測定しようとするサンプルすなわち検体（例えば全血液、血漿、血清、脳脊髄液、組織、臓器など）中に含有すると推定されるウイルス、細菌等によるDNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性をもち且つそのDNA又はRNAに対応する配列の内部に任意の部位に部分的に欠失又は挿入又は変異を有している、予めコピー数分かっている標準物質を指す。また競合体に用いるものは、合成RNA、プラスミドDNAでもDNA断片でも可能である。さらに競合体のDNA、RNAは、プライマー結合部分さえ本来の遺伝子と相同性があればその他の部分に別の遺伝子が入っていてもかまわない。競合体には欠失や変異又は挿入を入れなければならないが、あるいは欠失部分をプライマーとハイブリダイズしない配列に置き換えてPCRで増幅されないようにすることも可能である。

【0018】「部分的に相同性をもち」とは、センス又はアンチセンスプライマーが少なくとも結合可能な程度に相同性を有していればよいことを意味している。

【0019】「欠失又は挿入又は変異」については、センス又はアンチセンスプライマーが競合体1種類とのみアニールし、他の競合体とアニールしないように競合体の配列内部に適切に欠失、挿入または変異が導入される必要がある。ここで、「欠失」とはヌクレオチド配列の部分的欠損を意味し、「挿入」とは外来配列の付加を意味し、また「変異」とはヌクレオチドの置換、付加、欠失、修飾等の部分的変性を意味する。これらの欠失、挿入又は変異部位には、したがってプライマーによるアニーリングが不可能である。このように人為的変異を導入することによって、各競合体間で結果的に増幅領域が異なることとなり、したがって電気泳動上検出されるバンドのサイズが異なるために各競合体の識別が容易となる。

【0020】定量の対象となる核酸の種類としては、これらに限定されないが、例えばHIV（ヒト免疫不全ウイルス）RNA（Gonda, M. A., M. J. Braun, J. E. Clements, J. M. Pyper, F. Wong-Staal, R. C. Gallo, and R. V. Gallo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83:4007-4011; Wain-Hobson, S., P. Sonigo, O. Danos, S. Cole, and M. Alizon. Cell, 1985, 40:9-17.）、HBV（B型肝炎

ウイルス）DNA（Kaneko, S., R. H. Miller, S. M. Feinstone, M. Unoura, K. Kobayashi, N. Hattori, and R. H. Purcell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:312-316）、HCV（C型肝炎ウイルス）RNA（Takamizawa, A. C. Mori, I. Fuke, S. Manabe, S. Murakami, J. Fujita, E. Onishi, T. Andoh, I. Yoshida, and H. Okayama, J. Virol., 1991, 65:1105-1113.）、HDV（D型肝炎ウイルス）DNA、HTLV（ヒトT細胞白血病ウイルス）RNA（Bhagavati, S., et al. N. Engl. J. Med. 1988, 318:1141-1147.）、単純ヘルペスウイルスDNA、サイトメガロウイルスDNA（Demmler, G. J., G. J. Buffone, C. M. Schimbor, and R. A. May. J. Infect. Dis. 1988, 158:1177-1184.）、パルボウイルスDNA、ヒトパピローマウイルスHPV DNA（Cole, S. T., and O. Danos. J. Mol. Biol. 1987, 193:599-603.）、ロタウイルスDNA、日本脳炎ウイルスRNA、コクサッキーA、Bウイルス核酸（N. Iizuka, S. Kuga, and A. Nomoto. Virology, 1987, 156:64-73.）、ポリオウイルスRNA、アデノウイルスDNA、水痘ウイルス核酸、帯状ヘルペスウイルス核酸、結核菌DNA、クラミジアトラコマチスDNA、淋菌DNA、MRSA DNAなどが挙げられる。

【0021】競合体の調製に際しては、DNAを競合体として用いる場合は、直鎖状のDNA断片でも環状のプラスミドやコスミドのようなものでも可能である。DNA断片は一般的なDNA合成でも作製可能である。またPCRにより容易に増幅、調製可能である（詳しくは、Michael A. Innisら、「PCR Protocols」、Academic Press, Inc., (1990年)；Henry A. Erlich,「PCRテクノロジー」、宝酒造(1990年)に記載されている）。また、これらのDNAに欠失、挿入、変異を導入する方法はPCRによるものが容易である（前記の「PCR protocols」、 「PCRテクノロジー」参照）。その他の方法については、例えば「Molecular Cloning」Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年)に詳しく記載されている。当業者はここに示された文献類を参照するならば公知の核酸配列又は、遺伝子工学分野で一般的なDNA配列決定手順（前記「Molecular Cloning」Section 13: DNA Sequencing参照）に従って決定された核酸配列をベースとして容易に目的の競合体を作製することが可能であろう。さらに、RNAを競合体として用いる場合には、DNAの場合と同様に合成機を用いてRNAを直接合成してもよいし、あるいはDNAよりプロモーターによっても合成可能である。化学合成の詳細なプロトコールは後藤俊夫ら、「有機化学実験のてびき」[3]、[4]化学同人(1990年)に、またDNAよりの合成方法は前掲の「Molecular Cloning」等に詳しく示されており、これらの文献を参照するならば容易に実施可能である。

【0022】PCRに用いるプライマーの長さは増幅さ

せるDNA又はRNAと結合可能な長さであればよいが、一般に15~40塩基のもの、好ましくは20~30塩基のものが使用される。またプライマーの合成はマニュアルでも合成機を用いる方法でも可能であるが、合成方法は前述の「有機化学実験のてびき[3]、

[4]」に詳しく示されている。プライマーは、サンプルのRNA又はDNAと配列が同じ方が望ましいが、全く同一でなくても使用可能である。

【0023】PCRの手法については、前掲の「PCR Protocols」や「PCRテクノロジー」に詳細に記載されており、それらを参照して実施可能である。一般に、PCRサイクルは約94℃で変性(denaturation)すなわち2本鎖を1本鎖に解離する段階と、約55℃でアニーリング(annealing)すなわち鋳型核酸にプライマーを結合する段階と、約72℃で伸長(extension)すなわち鋳型に沿ってプライマーを伸長し相補鎖を合成する段階とから成り、これを1サイクルとして数サイクル以上、通常20サイクル以上繰り返し、必要に応じてその後約72℃で追加反応する。

【0024】検出すべき核酸がRNAの場合には、PCRに先立って逆転写酵素の作用下にcDNAに変換してもよい(前掲の「Molecular Cloning」参照のこと)。逆転写酵素としては、ニトリ骨髄芽球症ウイルス(A MV)由来RNA依存性DNAポリメラーゼ、マウスレトロウイルス由来(MMLV)RNA依存性DNAポリメラーゼなどを例示することができる。

【0025】サンプル中の核酸が(極)微量の場合には、第1PCRにかけて該核酸を一旦増幅するのが望ましく、また、この第1PCR時に競合体を共存させてもよく、あるいは増幅終了時に競合体を第2プライマーと共に後添加してもよい。好ましくは、第1PCR時に競合体を共存させておくのがよい。

【0026】サンプル中の微量のDNA又はRNAを競合PCR法で定量する場合には、本発明方法は、(i)サンプル中の前記DNA又はRNAと、少なくとも2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記DNA又はRNAと完全に又は部分的に相同性をもち且つ前記DNA又はRNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記DNAもしくは前記RNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1のセンス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記DNA又はRNAを増幅し、

(ii)ステップ(i)の増幅産物に、前記DNA又はRNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のセンス又はアンチセンスプライマーと、このプライマーに対応しこれと異なる配列を有し且つ前記競合体と同数の第2のアンチセンス又はセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体1種のみとアニーリング可能である前記第2のアンチセンス又はセンスプラ

イマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記DNA又はRNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、(iii)ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記DNA又はRNAのコピー数を決定する、ことを包含する。

【0027】この方法の最も簡便な例として、2種類の競合体を使用する方法を挙げることができ、これもまた本願発明の範囲に包含される。その具体例として、後述の実施例に示されるとおりのC型肝炎ウイルス(HCV)RNAの定量法が挙げられる。すなわち、その実施態様により、サンプル中の微量のC型肝炎ウイルスRNAを競合PCR法で定量する方法は、(i)サンプル中の前記RNAを予め逆転写酵素により変換して得たcDNAと、2種の、予備決定されたコピー数の競合体であって、前記cDNAと完全に又は部分的に相同性をもち且つ前記RNAに対応する配列の内部に部分的に欠失又は挿入又は変異をもつ競合体と、前記cDNA及び前記競合体とアニーリング可能な第1のセンス及びアンチセンスプライマーとを同一容器内で第1PCRにかけて前記cDNAを増幅し、(ii)ステップ(i)の増幅産物に、前記cDNA及びいずれの競合体ともアニーリング可能な1種の第2のアンチセンスプライマーと、このプライマーと異なる配列を有する2種の第2のセンスプライマーであって、各々が互いに異なる競合体のみとアニーリング可能である前記第2のセンスプライマーとを添加して競合PCR法にかけ、サンプル由来の前記cDNA及び前記競合体を鋳型とする互いに異なるサイズの増幅産物を得、(iii)ステップ(ii)の増幅産物を電気泳動分析にかけてサイズ分離し、その分離したバンドの濃さと競合体の前記コピー数とに基づいてサンプル中の前記RNAのコピー数を決定する、ことを包含する。

【0028】ここで、使用可能な2種の競合体の具体例は配列番号1(PK9)及び配列番号2(PK11)に示されるヌクレオチド配列を有し、また第1のセンスプライマーが5'-CCTGTGAGGAAGTACTGTC-3'(TM1)であり、第1のアンチセンスプライマーが5'-CACTCGCAAGCACCCCTATCA-3'(KM3)であり、第2のアンチセンスプライマーが5'-AACACTACTCGGCTAGCAGT-3'(MU8)であり、第2のセンスプライマーが5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3'(MU9)及び5'-AGCCATAGTGGTCTGCGGAACC-3'(MU11a)である。

【0029】図1がこれらの競合体とプライマーとの関係を模式的に示し、且つPCR結果を得られた増幅産物のサイズで示したものである。

【0030】native RNAは2nd PCR

で、MU9-MU8の組合せで203bpのバンドが、MU11a-MU8の組合せで130bpのバンドが増幅される。一方競合体PK9はMU11a-MU8で115bpのバンドが増幅されるが、MU9部分を欠失しているためにMU9-MU8では増幅されない。競合体PK11は逆にMU9-MU8で147bpのバンドが増幅されるが、MU11a-MU8ではMU11a部分を欠失しているために増幅されない。このため競合体PK9とnative RNAはMU11a-MU8で競合し、PK11とnative RNAはMU9-MU8で競合するため、1本のチューブ内で従来法の場合の2本分の競合反応が行なえることになる。

【0031】さらに本発明の方法は競合体の数を増やし、プライマーの数を増やすことにより1本のチューブですべての反応を行なうことが可能であるし、理論的には、すべての範囲の定量が可能である。競合体は通常 $1 \sim 10^7$ コピー添加されるが、これに限定されない。また、反応後のサンプルは希釈しても又は非希釈でもよく、希釈する場合には蒸留水や緩衝液等の溶媒で任意の希釈系列に調製することができる。

【0032】図2にHCVの場合の $1 \sim 10^7$ コピーまで検出可能な競合体とプライマーの組合せの1例を示している。図2において、サンプルの 10^0 とは非希釈状態を、また 10^{-1} とは10倍に希釈したことを示し、競合体(PK9、PK11)の $1, 10^2, 10^4, 10^5$ はともにコピー数を示す。チューブ1にはサンプルを希釈せずに加え、PK9を1コピー(実施例では加えず)とPK11を 10^2 コピーに加え、チューブ2にはサンプルを10倍希釈しPK9を 10^4 コピーとPK11を 10^5 コピー加えた。図の下はチューブ1とチューブ2の増幅産物を電気泳動したときの模式図である。各泳動像の左側のコピー数はサンプルのコピー数を示し、このコピー数の場合の泳動像を模式化した。黒い泳動物が競合体からの増幅産物、白い泳動物がサンプルからの泳動物を示している。例えば1コピーの場合はチューブ1のPK9(MU11a-MU8)1コピーとサンプル(MU11a-MU8)の増幅産物の量が同じためサンプル中のコピー数は約1コピーと判定される。また 10^4 コピーの場合はチューブ2中のPK9(MU11a-MU8) 10^5 コピーと10倍希釈されたサンプル(MU11a-MU8)の増幅産物の濃度が同じため $10^4 \times 10 = 10^5$ コピーと判定される。

【0033】増幅産物の検出は、一般に電気泳動、特にアガロースゲル電気泳動によって行なうのが望ましく、例えば臭化エチジウム染色または、 32 P等で放射性標識したプローブによるハイブリダイゼーション後オートラジオグラフィーによってバンドを識別することができる。

【0034】下記の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【0035】

【実施例】

実施例1

競合体用遺伝子のクローニング

慢性期のHCV肝炎患者血漿よりRT-PCR法により、HCV遺伝子のクローニングを行なった。

【0036】まず、C型肝炎患者血漿 $100 \mu\text{l}$ に6MのGTC液(6Mグアニジンチオシアネート、37.5mMクエン酸ナトリウム、0.75%ザルコシル、0.2Mメルカプトエタノール) $200 \mu\text{l}$ と酵母のt-RNA($10 \text{mg}/\text{ml}$) $1 \mu\text{l}$ を加え攪拌する。更に3M酢酸ナトリウム(pH5.2) $20 \mu\text{l}$ 、TE緩衝液[10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA]飽和フェノール(pH7.5~8.0) $30 \mu\text{l}$ 、クロロホルム/イソアミルアルコール(49:1) $70 \mu\text{l}$ を加え素早く混合し、10秒間攪拌した後、氷中に15分間静置する。遠心機で 15000rpm 、20分間4℃で遠心する。水層を採り、等量のイソプロピルアルコールと混合し-20℃に1時間以上置く。これを 15000rpm 、20分間4℃で遠心し、沈殿させる。沈殿物を4MのGTC(6M GTCを滅菌水で希釈したもの) $100 \mu\text{l}$ に溶解し、等量のイソプロピルアルコールと混合し、-20℃に1時間以上静置する。 15000rpm 、20分間、4℃で遠心し沈殿物を得る。70%エタノール 1ml で洗浄後、室温で風乾し、 $10 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解しRNAとして使用した。

【0037】cDNA合成はRNA $10 \mu\text{l}$ をシリコン処理チューブ(0.5ml)に分注した後、70℃、3分間加熱し、氷上で急冷する。次にRNAseインヒビター(宝酒造) $1 \mu\text{l}$ (50単位/ μl)、dNTPs(各20mM) $1 \mu\text{l}$ 、100mM DTT、5×RT緩衝液(250mM Tris-HCl(pH8.5)、375mM KCl、15mM MgCl₂) $4 \mu\text{l}$ 、ランダムオリゴヘキサマープライマー($100 \text{pmol}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$ 、逆転写酵素(BRL)(200単位/ μl) $1 \mu\text{l}$ を加え、滅菌水で合計 $20 \mu\text{l}$ に合わせる。42℃で2時間反応後、94℃で5分間加熱し酵素を失活させた。このcDNAを用いてPCRを行なった。PCRは検出DNAの増幅感度と特異性を上げる為に2ステップ法を用いた。即ち、まず2種のプライマーで1回目のPCRをかける(1st step PCR)。次にそのPCR産物のDNA配列の内側に存在する2種のプライマーを用いて2回目のPCRにかける(nested-PCR)方法である。

【0038】5' UTR領域からCOREの領域のDNA産物を増幅させるために既報の配列(TAKAMIZAWA, A., et al, J. Virol., 1991, 65:1105-1113)を参考にしプライマーを合成した。1st PCRに用いたプライマーはKK28 5'-GCGACACTCCACC ATAGATC-3', KK29 5'-AACTCC ACCAACGATCTGAC-3'であり、2nd

PCRにはKK285'-GCGACACTCCACC
ATAGATC-3', KK31 5'-CCGGGA
ACTTGACGTCCTGT-3'を用いた。

【0039】PCRの条件は、0.5mlチューブ中に
上記cDNA合成反応液を20 μ lと10 \times PCR緩衝
液(100mM Tris-HCl (pH8.3)、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1% gelatine) 8 μ l、1st step プライマー2
種(各75 pmole)、2mM dNTPs 8 μ lを加え、
滅菌水で100 μ lにする。94 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、
Ampli Taq(Perkin-Elmer-Cetus) 1 μ l (5単位)を加え
10 攪拌後、ミネラルオイルを重層し軽く遠心する。PC
R反応は、変性94 $^{\circ}$ C1分間、アニーリング55 $^{\circ}$ C1分
間、伸長72 $^{\circ}$ C2分間の条件で30サイクル行なった。
次に新しい0.5mlチューブに1st PCR反応終
了液10 μ l、10 \times PCR緩衝液9 μ lを加え、2nd
step プライマー2種(各75 pmole)、1mM dNT
P s 9 μ l、滅菌水で100 μ lとする。94 $^{\circ}$ Cで10
分間加熱し、Ampli Taq 1 μ l (5単位)を加え攪拌
後、ミネラルオイルを重層し軽く遠心し、先の条件で2
nd PCRを行なう。反応後、反応液10 μ lをアガ
20 ロースゲル電気泳動し、特異的に増幅されたDNA断片
を検出した。

【0040】PCRで増幅したDNA断片PKI5 (約
400bp)を低融点アガロース電気泳動により単離
し、滅菌水200 μ lを加え、68 $^{\circ}$ C15分間ゲルを溶
解させた。TE緩衝液[10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM
EDTA] 飽和フェノールで2回抽出操作を行ない、DNA
断片が溶解している水層をエタノール沈殿した。沈殿物
に10 \times キナーゼ緩衝液(0.5M Tris-HCl pH7.6、0.1M
MgCl₂、50mM DTT、1mM スペルミジン、1mM EDTA pH
8.0) 2 μ l、10mM ATP 1 μ l、T4キナーゼ(宝酒
造) 1 μ l (10単位/ μ l)を加え滅菌水で20 μ l
とし、37 $^{\circ}$ C1時間反応し、5'末端のリン酸化を行な
う。68 $^{\circ}$ Cで10分間加熱し、キナーゼを失活させた後
pUC18との連結反応を行なう。pUC18 (1 μ
g)は制限酵素反応液20 μ l [10mM Tris-HCl pH8.0
、7mM MgCl₂、20mM KCl、10単位のSmaI酵素
(宝酒造)] 中で37 $^{\circ}$ Cで1時間反応し、68 $^{\circ}$ Cで10
分間加熱した後、滅菌水80 μ lを加え、SmaIクロー
ニングベクターとする。リン酸化されたDNA断片1
0 μ lとSmaIベクター2 μ lを10 \times 緩衝液(0.66
M Tris-HCl pH7.6、50mM MgCl₂、50mM DTT) 2 μ l、
10mM AT T 1 μ l、T4リガーゼ(宝酒造) 1
 μ l (350単位/ μ l)、滅菌水4 μ lを加え、20
 μ lとし、16 $^{\circ}$ Cで一晩連結反応を行なった。

【0041】この反応液の10 μ lを用いて大腸菌JM
109株を形質転換した。形質転換に用いる感受性大腸
菌株は、Hanahanの方法[DNA cloning: A prac
tical approach, IRC Press (1985)]により作られる。

【0042】形質転換大腸菌2% X-Gal (5-ブ

ロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクト
ピラノシド) 50 μ lと100mM IPTG (イソプ
ロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) 10 μ lが
塗布されたLB-Ampプレート[1%トリプシン、
0.5%酵母エキス、0.5% NaCl、1.5%寒
天、アンピシリン(50 μ g/ml)]上で37 $^{\circ}$ C一晩
培養した。プレート上に生じたコロニーの中で白色を呈
するコロニーを一白金耳取り、50 μ g/mlアンピシ
リンを含むLB培地(1%トリプトン、0.5%酵母エ
キス、0.5%NaCl)に移し、一晩37 $^{\circ}$ Cで振盪培
養した。1.5mlの菌培養液を遠心して集菌し、プ
ラスミドDNAのミニプレパレーションをアルカリ法(M
aniasら、Molecular Cloning: A Laboratory
Manual, 1982)により行なった。得られたプラスミド
DNA1 μ gを反応液30 μ l (100mM Tris-HCl pH7.
5、50mM NaCl、7mM MgCl₂、10単位のEcoRI (宝
酒造)およびHindIII (宝酒造) 酵素) 中で37 $^{\circ}$ C1
時間消化し、アガロースゲル電気泳動を行なって挿入D
NA断片の大きさを計算する。約400bpの挿入DN
A断片が検出されるクローンをPKI5と命名した。得
られたクローンをSangerらのジデオキシ鎖終止法
[Sanger, F. Science, 214, 1205~1210 (1981)]を
用いて、挿入NS3 DNA断片の塩基配列及びアミノ
酸配列を決定した。

【0043】また、得られたプラスミドDNAをPKI
5と名付けた。

【0044】実施例2

競合体DNA PKI5/Dの構築

得られたプラスミドPKI5の5'UTR領域に15b
pの欠失を導入するためPCR法を行なった。2本のプ
ライマー、BA2 5'-ACCGGTTCCGCAG
ACCACTA-3'とBA3 5'-GCCAGGA
CGACCGGGTCCTT-3'を用いて、100p
gのPKI5のDNAを鋳型に50pmolの上記プライマ
ー、10 \times PCR反応液(100mM Tris-HCl (pH8.3)、50
0mM KCl、15mM MgCl₂、0.1% gelatine) 5 μ l、2m
M dNTPs 5 μ lを加え、滅菌水で50 μ lと
し、1.25単位(0.25 μ l)のTaq DNA polymera
se (宝酒造)を加え、ミネラルオイルを重層し、軽く遠
心した。PCRのサイクルは、94 $^{\circ}$ C1分、55 $^{\circ}$ C1.
5分、72 $^{\circ}$ C3分の条件で30サイクル反応を行ない、
最後に72 $^{\circ}$ C7分間反応させた。反応液10 μ lをアガ
ロース電気泳動にかけ、約3kbpのDNA断片を分離
した。分離したDNAをガラスパウダー法(Gene Clean
II、BI0101社)により50 μ lのTE溶液[10mM Tri
s-HCl (pH7.5)、1mM EDTA]に回収した。このDNA10
 μ lとligation A液25 μ lとligation
B液5 μ l (DNAライゲーションキット、宝酒
造)を加え、良く混合した後16 $^{\circ}$ C、3時間反応を行な
50 わせた。得られたDNA溶液10 μ lを用いて、大腸菌

XLI-blue (Stratagene社)をHanahanの方法(前掲)に従って形質転換させた。

【0045】得られたクローンから、アルカリ-SDS法によりDNAをミニプレペレーションし、このDNA約1ngを用いPCRを行なった。以下のプライマーMU9 5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3', MU10 5'-GTTTATCCAAGAAAGGACCC-3'を用い、10×PCR反応液5μl、2mM dNTP 5μl、Taq DNAポリメラーゼ0.25μl(1.25単位)、MU9、MU10のプライマー各50pmolに滅菌蒸留水を加え50μlとし反応させた。PCRのサイクルは94℃1分、55℃1分、72℃1分で30サイクル行なった。対照としてPK15のDNA1ngを用い、同じ反応を行なったところ、PK15では144bpのDNA断片が増幅されてきた。得られたクローンの中に約129bpのDNA断片が増幅されてくるものがあった。これをPK15/Dと名付けた。

【0046】実施例3

競合体DNA PK9、PK11の構築

さらに図1に示すような競合体DNA PK9、PK11を得るためさらにPCRを行なった。PK9の構築用のプライマーはBA5 5'-CCATGGCGTTAGTATGAGTG-3'とBA4 5'-GACAGTAGTTTCCTCACAGGG-3'である。PK11用のプライマーはBA3 5'-GCCGGGAAGACTGGGTCTCTT-3'とBA6 5'-GCTGGAGGCTGTACGACAC-3'を用いた。詳しいプロトコールはプライマー以外は実施例2と同様である。形質転換後、ブランクより大腸菌を培養し、プラスミドDNAをミニプレペレーションした。競合体DNA PK9とPK11を得るため、プライマーMU9 5'-TTCACGCAGAAAGCGTCTAG-3'とMU8 5'-AACACTACTCGGCTAGCAGT-3'の組合せとMU11a 5'-ACGCATAGTGGTCTGCGGAACC-3'とMU8の組合せでPCRを行なった。PK9用は、MU11a-MU8の組合せで115bpのDNA断片が増幅し、MU9-MU8の組合せで増幅がかからないクローンを選択し、PK9と名付けた(図1参照)。PK11用はMU11a-MU8の組合せで147bpの増幅がかからず、MU9-MU8で147bpのDNA断片が増幅されるクローンを選りPK11と名付けた(図1参照)。

【0047】実施例4

PK9、PK11を用いた競合法によるサンプルの測定
まず、得られたクローンPK9、PK11のDNAの精製を行なった。PK9およびPK11によって形質転換されたXL-blueをLB培地50mlで1昼夜培養し、菌体を得た。この菌体より、アルカリ-SDS法

によるDNA抽出の変法であるQIAGEN(フナコシ)のキットを用い、プロトコールに従い、DNAの精製を行なった。

【0048】得られた環状DNA PK9およびPK11 10μgをそれぞれ制限酵素EcoRIで消化した。10×H buffer(宝酒造)5μl、DNA 10μg、EcoRI(宝酒造)100単位に滅菌水を加え50μlとし、37℃1時間加温した。この溶液をフェノール/クロロホルム処理3回、クロロホルム処理1回により蛋白を除去した。エタノール沈殿後滅菌蒸留水10μlに溶解した。このDNA溶液濃度を分光光度計で測定し、分子量とOD値より分子数(又はコピー数)を計算した。また、公知の配列決定法によりPK9、PK11の配列を確定し、PK9及びPK11のヌクレオチド配列をそれぞれ配列番号1、2として示した。各ヌクレオチド配列中の星印(*)は欠失を示す。

【0049】このPK9、PK11のDNA溶液をキャリアとして100μg/mlのtRNA(ペーリンガーマンハイム)が入った滅菌蒸留水で10倍段階希釈し、1コピー/10μlから10倍ずつの希釈系列を得た。nested PCRを行なうことにより、この5' UTR領域は1コピーまで検出可能なので、1st PCRにMU7-MU8のプライマー、2nd PCRにMU9-MU10のプライマーを用い常法に従いPCRを行ない、1コピー/10μl(0.5コピー/5μl)のDNA(PK9、PK11)が存在することを確認した。

【0050】この希釈した競合体DNAを用いて、2チューブでの定量を行なった。

【0051】HCV患者血清100μlよりRNA抽出用溶液ISOGEN(ニッポンジーン)を用いてRNAを抽出するISOGEN 400μlにtRNA(10mg/ml)を1μl、2-メルカプトエタノール4μl、クロロホルム80μlを加え、プロトコールに従いRNA抽出を行なう。イソプロパノールによる沈殿後、70%エタノールで4回洗浄し、室温風乾し、10μlの滅菌水に溶解し、RNAとして用いた。

【0052】cDNA合成はRNA10μlをシリコン処理したチューブに分注し、70℃、3分間加熱し、氷上で急冷する。次にRNaseインヒビター(宝酒造)50単位、20mM dNTP 1μl、5×RT緩衝液(BML MMLV RTaseに添付)4μl、100mM DTT 2μl、アンチセンスプライマーKM3 10pmol、MMLV逆転写酵素200単位を加え滅菌水で20μlにする。42℃で30分間保持する。

【0053】このcDNAを用いてPCRを行なう。図2に示すように、1本目のチューブにcDNAを希釈せずに10μl加える。これにPK9を1コピー、PK11を10²コピーとなるように加える。2本目のチューブにはcDNAを10倍希釈し10μl加え、PK9を

17

10³ コピー、PK11を10⁵ コピー加える。これに10×PCR緩衝液4μl、2mM dNTP 5μl、Taq DNAポリメラーゼ 0.25μl (1.25単位)さらにプライマーTM1 10pmol、KM3 10pmolを加え、滅菌水で50μlにする。PCRサイクルは94℃4分加熱後、94℃1分、51℃1分30秒、72℃1分30秒で20サイクル行ない、最後に72℃6分保温する。

【0054】この1st PCR産物3μlを用い2nd PCRを行なう。10×PCR緩衝液3μl、2mM dNTP 3μl、Taq DNAポリメラーゼ 0.25μl (2.5単位)プライマーMU9、MU11a、MU8をそれぞれ50pmolずつ加える。さらに滅菌水を加え30μlにする。PCRサイクルは94℃4分加熱後、94℃50秒、55℃1分、72℃1分10秒で53サイクル行なった。

【0055】従来の競合法で10⁴～10⁵ コピーと判定された検体をcDNA合成後に10倍段階希釈し、10⁰ 希釈、10⁻¹ 希釈、10⁻² 希釈、10⁻³ 希釈、10⁻⁴ 希釈、10⁻⁵ 希釈し、上記のプロトコルを若干変更して定量を行なった。変更点は1本目のチューブにPK9 1コピーを加えず、PK11 10² コピーのみを加えた点である。

【0056】図3に写真を示すが、この写真で×100000が0コピー、×10000が1コピー、×1000が10コピー、×100が10² コピー、×10が10³ コピー、×1が10⁴ コピーとなり良好な希釈直線性が得られている。泳動像とコピー数の関係は図2に示した通りである。

【0057】

【発明の効果】本発明の特徴は、競合法とプライマーを複数使用する点にある。このためにPCRのチューブを格別に減らすことが可能となった。例えば10⁰～10⁷ コピー/mlの範囲を測定する場合、1つの競合体と2種のプライマー（センスとアンチセンスプライマー）では基本的に8本のチューブが必要であった。これが2つの競合体と3種のプライマー（1本のセンスと2本の*

配列

```
GCGACACTCC ACCATAGATC ACTCCCCTGT GAGGAACCTAC TGTC***** 44
***CCATGG CGTTAGTATG AGTGTCGTAC AGCCTCCAGG CCCCCCCTC CCGGAGAGC 100
CATAGTGGTC TCGGAACCG GT***** *****GCC AGGACGACCG GGTCTTTCT 145
TGGATTAACC CGCTCAATGC CTGGAGATT TGGCGTGCCC CCGCGAGACT GCTAGCCGAG 205
TAGTGTGGG TCGCAAAGGC CTTGTGGTAC TGCCTGATAG GGTGCTTGC AGTGCCCGG 265
GAGGTCTCGT AGACCGTGCA CCATGAGCAC GAATCCTAAA CCTCAAAGAA AAACCAAACG 325
TAACACCAAC CGCCGCCAC AGGACGTCAA GTTCCCGG 363
```

配列番号：2

配列の長さ：342

配列の型：核酸

配列

```
GCGACACTCC ACCATAGATC ACTCCCCTGT GAGGAACCTAC TGTCTTACG CAGAAAGCGT 60
```

18

*アンチセンスプライマーあるいは2本のセンスと1本のアンチセンスプライマー）を用い、検体を希釈することによって2本のチューブに減らすことが可能である。さらに4つの競合体と5本のプライマーを用いることにより、1本のチューブに減らすことが可能である。

【0058】このように、PCR時のチューブ数が減らせることによって以下のような作用効果が得られる。

【0059】(a)作業時間の短縮

PCRを行なう前のスタンダードの希釈、分注、検体の希釈、分注等に掛かる時間が現在の方法の約1/2（チューブ2本の場合）からほとんどなし（チューブ1本の場合）まで短縮可能である。従来法では12検体行なった場合、準備も含めて約2時間程度かかる。

【0060】(b)作業効率の向上

シータス社のPCRの機械を使用した場合、一度に48本のチューブのPCRができるので、従来法では1回のPCRで、6検体（8本/1検体）の処理が可能であるのに対し、本発明の方法では、2本/1検体で定量すると24検体の処理が可能であり、また1本/1検体では48検体の処理が可能である。

【0061】(c)コストの削減

PCRでの費用で最もかかるものは耐熱性の酵素であるTaq DNAポリメラーゼであるがチューブ8本を2本に減らすことによりその費用は1/4、さらに1本に減らすことにより1/8になる。さらにチューブが減ることによりそれに付随してチップ等の経費も減らすことができる。労賃も含めて全体的に経費節減を可能にする。

【0062】

30 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：363

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：

CTAGCCATGG CGTTAGTATG AGTGTCGTAC AGCCTCCAGG C***** 101
 ***** ***** ***** *****GCC AGGACGACCG GGTCTTTCT 124
 TGGATTAACC CGCTCAATGC CTGGAGATTG GGGCGTGCCC CCGCGAGACT GCTAGCCGAG 184
 TAGTGTTGGG TCGCAAAGGC CTTGTGGTAC TGCCTGATAG GGTGCTTGC GAGTCCCGG 244
 GAGGTCTCGT AGACCGTGCA CCATGAGCAC GAATCCTAAA CCTCAAAGAA AAACCAAACG 304
 TAACACCAAC CGCCGCCAC AGGACGTCAA GTTCCCGG 342

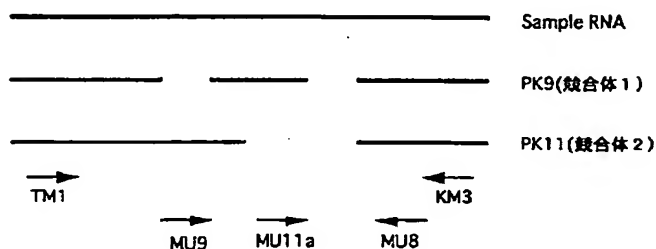
【図面の簡単な説明】

【図1】この図は、競合PCR法によるHCV RNAの定量法に使用される2つの競合体と、1つのアンチセンスプライマー及び2つのセンスプライマーとの関係、並びにサンプルRNA及び各競合体の増幅産物のサイズを示す。

【図2】この図は、サンプル中のHCV RNAを本発明の方法で定量化したときの、RNAコピー数の判定の仕方を電気泳動像を用いて説明したものである。 *

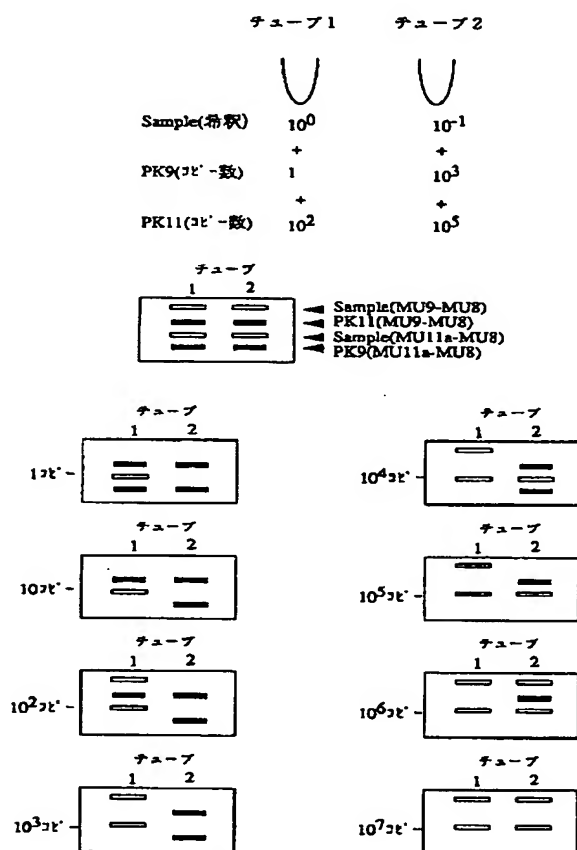
* 【図3】この図は、従来法による測定で $10^1 - 10^5$ コピー/μlのHCV-RNAを含む検体をcDNA合成後、10倍階段希釈し、2チューブで定量を行なった結果を示した写真である。1が1本目のチューブの泳動像を、2が2本目のチューブの泳動像を示しており、1と2の組みで1つの検体を示している。×1が 10^1 コピー/チューブ、×10000が1コピー/チューブと判定され、良好な希釈直線性を示している。

【図1】

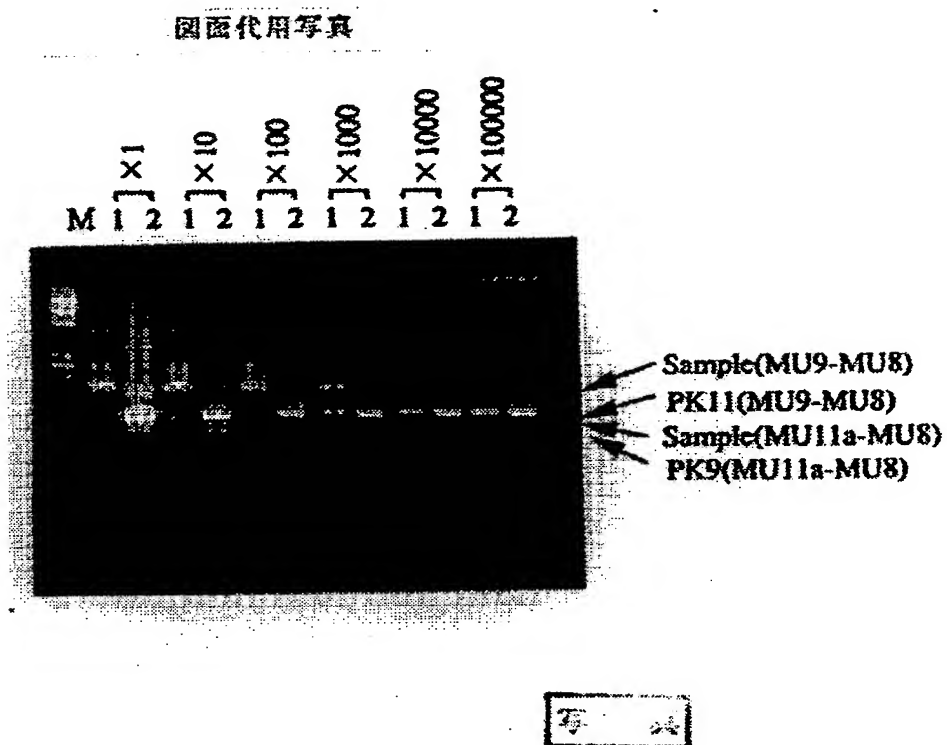


| | MU9-MU8 | MU11a-MU8 |
|------------|---------|-----------|
| Sample RNA | 203 | 130 |
| PK9(競合体1) | - | 115 |
| PK11(競合体2) | 147 | - |

【図2】



【図3】



フロントページの続き

(74) 上記 2 名の代理人 弁理士 川口 義雄 (外 2 名)

(72) 発明者 田中 栄司
長野県松本市岡田松岡 73-5

(72) 発明者 松本 晶博
長野県松本市桐 2-3-26 F Y コーポ
203 号室

(72) 発明者 山口 健次郎
埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡一丁目 3 番 1
号 東燃株式会社総合研究所内